Chaperone Competent Cells
BL21 系列

使 用 说 明 书

TaKaRa Code：D9120-9125

Shipping at -80°C
Stored at -80°C

制品说明

Chaperone Competent Cells BL21 Set 是由分别转化一种伴侣蛋白质粒（Chaperone Plasmid Set (TaKaRa Code：D3340)）的 *E.coli* BL21 制成的感受态细胞。可直接转化靶蛋白表达质粒。*E.coli* BL21 来源于 B 株，为 *Lon* 蛋白水解酶、*omp*T 外膜蛋白水解酶缺陷型，因此,表达的外源蛋白在该体系中有更高的稳定性，常用于表达外源蛋白。然而，在 *E.coli* 中表达的外源蛋白常常会发生各种问题，例如，形成不溶的包涵体（Inclusion bodies）等。原因大多是表达的蛋白质没有进行正确的折叠。

本制品中含有五种类型的质粒(pG-KJE8、pGro7、pKJE7、pG-Tf2、pTf16)，每一种质粒都是能有效表达一组协同作用、共同参与蛋白折叠的被称作"Chaperone team"的分子伴侣。靶蛋白与其中一种"Chaperone team"共同表达，便可增加可溶性蛋白质的回收比率，而用通常方法，由于包涵体的形成，这些表达蛋白质常常是不可回收的。

当进行靶蛋白与"Chaperone team"共表达实验时，通常需要三步：1. 用伴侣蛋白质粒转化宿主 *E.coli*； 2. 用转化体制备感受态细胞；3. 靶蛋白表达质粒转化感受态细胞。如果使用本产品，只需一步转化就可构建靶蛋白与"Chaperone team"的共表达体系，因为使用的 *E.coli* BL21 感受态细胞已转化有一种伴侣蛋白质粒。

Chaperone Competent Cells BL21 有五种类型，非常适合于表达外源蛋白。但该产品不适合于启动子为 T7 的蛋白质表达体系：如 pET 系列，因为作为宿主 *E.coli* BL21 株不表达 T7 RNA 聚合酶。

注意：本产品不可用电冲击法转化。

制品内容

Chaperone Competent Cells BL21 Set（D9120）

组份名称	包装量
Chaperone Competent Cell pG-KJE8/BL21	100 μl×3支
Chaperone Competent Cell pGro7/BL21	100 μl×3支
Chaperone Competent Cell pKJE7/BL21	100 μl×3支
Chaperone Competent Cell pG-Tf2/BL21	100 μl×3支
Chaperone Competent Cell pTf16/BL21	100 μl×3支
TaKaRa Competent Cell BL21	100 μl×3支
pUC19 DNA（0.1 ng/μl）	10 μl×1支

Chaperone Competent Cell pG-KJE8/BL21（D9121）

组份名称	包装量
Chaperone Competent Cell pG-KJE8/BL21	100 μl×10支
pUC19 DNA（0.1 ng/μl）	10 μl×1支

Chaperone Competent Cell pGro7/BL21（D9122）

组份名称	包装量
Chaperone Competent Cell pGro7/BL21	100 μl×10支
pUC19 DNA（0.1 ng/μl）	10 μl×1支

Chaperone Competent Cell pKJE7/BL21（D9123）

组份名称	包装量
Chaperone Competent Cell pKJE7/BL21	100 μl×10支
pUC19 DNA（0.1 ng/μl）	10 μl×1支

Chaperone Competent Cell pG-Tf2/BL21（D9124）

组份名称	包装量
Chaperone Competent Cell pG-Tf2/BL21	100 μl×10支
pUC19 DNA（0.1 ng/μl）	10 μl×1支

Chaperone Competent Cell pTf16/BL21（D9125）

组份名称	包装量
Chaperone Competent Cell pTf16/BL21	100 μl×10支
pUC19 DNA（0.1 ng/μl）	10 μl×1支

TaKaRa Competent Cell BL21（D9126）

组份名称	包装量
TaKaRa Competent Cell BL21	100 μl×10支
pUC19 DNA（0.1 ng/μl）	10 μl×1支

表 1：各质粒编码的伴侣蛋白种类及诱导物

No	Plasmid	Chaperone	Promoter	Resistant Marker	Inducer (终浓度)
1	pG-KJE8	dnaK-dnaJ-grpE	*araB*	Cm	L-Arabinose (0.5-4 mg/ml)
		groES-groEL	*Pzt-1*		Tetracyclin (1-10 ng/ml)
2	pGro7	groES-groEL	*araB*	Cm	L-Arabinose (0.5-4 mg/ml)
3	pKJE7	dnaK-dnaJ-grpE	*araB*	Cm	L-Arabinose (0.5-4 mg/ml)
4	pG-Tf2	groES-groEL-tig	*Pzt-1*	Cm	Tetracyclin (1-10 ng/ml)
5	pTf16	tig	*araB*	Cm	L-Arabinose (0.5-4 mg/ml)

〈可使用的表达质粒〉
伴侣蛋白质粒带有来源于pACYC的复制原点和氯霉素抗性基因（Cm^r基因），*E.coli* 表达体系中如使用常用的ColE1型、具有氨苄抗性（Amp^r）筛选标记的表达载体是允许的。各伴侣蛋白基因位于ara*B*启动子或*Pzt*-1（*tet*）启动子下游，而目的基因处于lac或其它启动子的控制之下，目的蛋白质与伴侣蛋白可分别诱导表达。另外，对启动子必要的元件（*araC*或*tetR*）也配置在质粒上。需注意的是该伴侣蛋白质粒不可与含有氯霉素抗性基因的表达质粒共同使用。
需特别指出的是，本制品如与冷休克表达载体 pCold DNA系列（TaKaRa Code：D3360 - D3364）结合使用，会达到更好的效果。
本制品中作为宿主使用的*E.coli* BL21株不能表达T7 RNA聚合酶，pET等利用T7启动子的表达载体不能在此使用。

保　存
1. -80℃。如果未保存在-80℃条件下，转化效率会降低。当担心转化效率降低时，请使用本试剂盒中提供的pUC19做转化实验，确认转化效率。
2. 不要将该制品保存在液氮中。

实验操作
1. 感受态细胞使用前在冰中融化。
2. 融化后，轻柔混合均匀，取100 μl移入Falcon tube中（不可以Vortex）。
3. 加入目的蛋白表达用质粒（10 ng以下）。
4. 冰中放置30分钟。
5. 42℃放置45秒。
6. 立即移入冰中放置1-2分钟。
7. 加入37℃预温的SOC培养基900 μl。
8. 37℃振荡培养1小时(160-225 rpm)。
9. 将适量培养液涂布在含有抗生素的LB平板上。
10. 37℃过夜培养。

注1）对于Chaperone Competent Cells，选用的LB平板应同时含氯霉素（20 μg/ml）及表达质粒选择性生长所需的抗生素（氨苄青霉素50-100 μg/ml等）。当使用TaKaRa Competent Cell BL21时，LB平板中只含表达质粒选择性生长所需的抗生素就可以了。
注2）使用直径9 cm的平板时，请取100 μl以下的培养液涂布平板。

使用注意
1. 感受态细胞一定要用干冰运输。
2. 只取出需要量的感受态细胞，融化过的感受态细胞建议不要再使用。如想继续使用，请在干冰/乙醇中冻结，-80℃保存，此时转化效率可能会降低 1 个数量级以上。
3. 使用 100 μl 感受态细胞转化时，待转化 DNA 的纯度非常高时，使用量一定控制在 10 ng 以下，否则效率会降低。
4. 转化规模改变（如感受态细胞使用量发生改变），或换用了其它 tube 等，需研讨转化条件（使用一般的 1.5 ml tube 时，请于 42℃保温 60 秒）。
5. 除 SOC 培养基外，L-broth 及φb-broth 也可使用，但转化效率会有所下降。
6. 本制品中含有的伴侣蛋白质粒带有来源于pACYC的复制起点和氯霉素抗性基因（Cm^r基因），*E.coli*表达系统中可以使用常用的 ColE1 型、具氨苄抗性（Amp^r）筛选标记的表达载体，但不可与含有氯霉素抗性基因的表达质粒共同使用。

共表达实验
培养基中需加入目的蛋白表达质粒选择性生长所需的抗生素、伴侣蛋白质粒选择性生长所需的抗生素（氯霉素20 μg/ml）以及与各伴侣质粒种类相对应的诱导物（参见表1）。当细胞生长受到阻害较大时，诱导物应避免在培养开始时添加，需要添加时，再将其加入。
最有效的伴侣蛋白种类、培养条件（培养基、培养温度、通气条件、诱导起始时刻、诱导物浓度、诱导时间等等）均由于表达的目的蛋白的不同而不同。因此，建议研讨目的蛋白表达的最佳条件。
以下为插入外源目的基因的冷休克载体pCold I DNA（氨苄抗性）与伴侣质粒共表达实验例。

1. 准备含20 μg/ml氯霉素、50-100 μg/ml氨苄青霉素、表达诱导用0.5-4 mg/ml L-Arabinose，以及(或者)1-10 ng/ml Tetracyclin的 LB 培养基。伴侣蛋白质粒是pG-KJE8时，同时选用L-Arabinose和Tetracyclin；伴侣蛋白质粒是pGro7、pKJE7、pTf16时，只选用L-Arabinose；伴侣质粒是pG-Tf2时，只用Tetracyclin即可。

* **请先尝试使用0.5 mg/ml L-Arabinose和5 ng/ml Tetracyclin。低浓度的Tetracyclin对大肠杆菌的生长不会有太大影响。**

2. 将同时含有pCold I DNA和Chaperone Plasmid的菌株接种到培养基中，37℃振荡培养。
3. 当OD_{600}=0.4-0.6时，于15℃放置30分钟。
4. 加入IPTG，使其终浓度为0.1-1.0 mM，15℃振荡培养24小时。
5. 培养结束后，根据SDS-PAGE电泳、活性测定等结果确认目的产物的表达量及溶解性。

感受态细胞的转化效率
每种Chaperone Competent Cell都分别用1 ng的pUC19 DNA转化，并在Cm^+、Amp^+的LB平板上培养；TaKaRa Competent Cell BL21同样用1 ng的pUC19 DNA转化，在Amp^+的LB平板上培养。经确认，每种感受态细胞的转化效率都大于10^6 cfu/μg pUC19 DNA。

Genotype
E.coli BL21：F$^-$, *ompT*, *hsdS*B (r_B^- m_B^-), *gal*, *dcm*

NOTICE TO PURCHASER : LIMITED LICENSE
D9120,D9121,D9123：[M7] Chaperone plasmid
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 6,159,708 and its foreign counterpart patent claims.
D9120,D9124：[M8] Chaperone plasmid
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 6,197,547 and its foreign counterpart patent claims.